

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y

Biotechnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



FORMULACION Y OPTIMIZACION DE INMUNOLIPOSOMAS, PARA LA
ENCAPSULACION DE LA MACAMIDA SINTETICA *N-3-METOXIBENCIL-
LINOLEAMIDA*, UTILIZANDO FRAGMENTOS (Fab)₂ DEL ANTICUERPO OX26
COMO MOLECULA DE BIORECONOCIMIENTO

Tesis presentada por la Bachiller:
Aranzamendi Zenteno, María Alexandra
Para optar el Título Profesional de:
Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:
Dra. Nieto Montesino, Rita Milagros

AREQUIPA – PERÚ

2019

y *Bi TECNOLÓGICAS*
Escuela Profesional de Ingeniería Bi TECNOLÓGICA

Nº Trámite en Fac. 375-2017
Fecha Recep. Fac. 19-12-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: *ARANZAMENDI ZENTENO, Maria Alexandra*

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"OPTIMIZACION DE UNA FORMULACION DE LIPOSOMAS PARA LA ENCAPSULACION DE FARMACOS HIDROFOBICOS"

DICTAMINADORES: *Q. F. Fernando Torres Vela* 2) *Mgter. Jaime Barreda del Carpio*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMAS: *[Signature]* *[Signature]* (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA *16-01-2018*

ASESOR: *Dra. Rita Nieto Montesinos*

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: *"FORMULACION Y OPTIMIZACION DE INMUNO LIPOSOMAS, PARA LA ENCAPSULACION DE LA MACAMIDA SINTETICA N-3-METOXIBENCIL-LINOLEAMIDA, UTILIZANDO FRAGMENTOS (Fab)₂ DEL ANTICUERPO OX26 COMO MOLECULA DE BIORECONOCIMIENTO"*, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente
FIRMA *[Signature]* FECHA *24/10/2019*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Q. F. Fernando Torres Vela*
- 2) *Mgter. Jaime Barreda del Carpio*
- 3) *Mgter. Jose Carpio Carpio*

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMA *[Signature]* *[Signature]* *[Signature]* (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE *Q.F. FERNANDO TORRES VELA*
VOCAL *MAG. JAIME BARREDA DEL CARRIO*
SECRETARIO *MAG. JOSE CARRIO CARRIO*

FECHA *27/11/19* HORA *20.00* LOCAL *B-406*

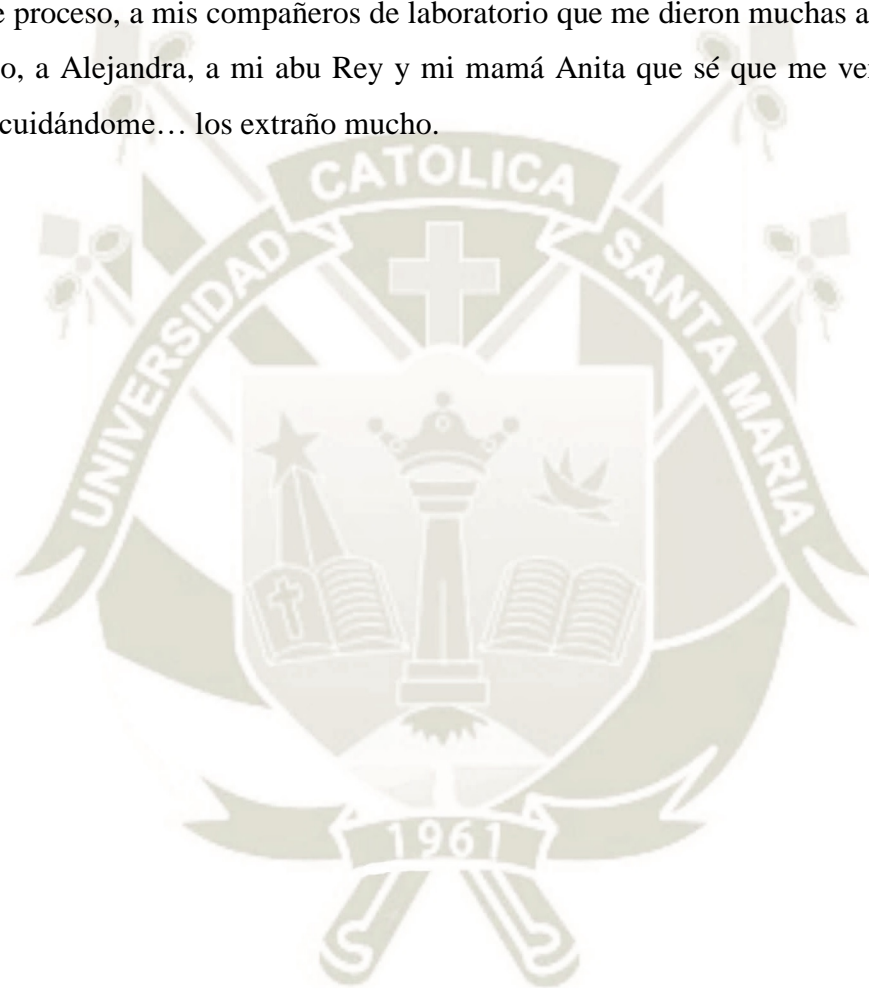
FIRMA DEL DECANO

FECHA

DEDICATORIA

A mi familia, que me apoyaron en este proceso, a mis padres Guillermo y Jacqueline, mis hermanos Kerin y Fabrizio, quienes me brindaron el apoyo necesario para la realización de este proyecto.

A mis amigos Jesús, Giancarlo, Gabriela y Alexandra, que me ayudaron en la realización de este proceso, a mis compañeros de laboratorio que me dieron muchas alegrías en este proceso, a Alejandra, a mi abu Rey y mi mamá Anita que sé que me ven desde algún lugar, cuidándome... los extraño mucho.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme todo para lograr este título profesional, a mis familiares que con su apoyo me dieron el impulso para lograr esta meta.

Al Dr José Villanueva, por su constante apoyo y consejos recibidos durante mi formación académica y la realización de este trabajo.

A mi asesora, la Dra. Rita Nieto Montesinos, por su apoyo y paciencia al otorgarme sus conocimientos sobre nanotecnología.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) - Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), por el financiamiento recibido para el desarrollo de esta investigación, mediante el proyecto: “Diseño, caracterización y evaluación de liposomas a base de macamidas, vectorizados al sistema nervioso central para el tratamiento de la epilepsia 096-2015-Fondecyt”.



FUENTE: CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	xvii
HIPÓTESIS.....	xx
OBJETIVOS	xxi
Objetivo General:	xxi
Objetivos Específicos:.....	xxi
CAPITULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Nanomedicina:.....	1
1.2 Nanovectores	2
1.3 Tipos de nanovectores:	2
1.4 Nanovectores lipídicos:	3
1.5 Fosfolípidos	4
1.6 Liposomas:.....	5
1.6.1 Tipos de liposomas:	7
1.6.1.1 Liposomas o vesículas multilamelares (MLV)	7
1.6.1.2 Liposomas o vesículas unilamelares grandes (LUV)	7
1.6.1.3 Liposomas o vesículas unilamelares pequeñas (SUV)	7
1.6.1.4. Liposomas convencionales	7
1.6.1.5 Liposomas catiónicos	8
1.6.1.6 Liposomas de circulación prolongada, furtivos o liposomas Stealth ..	8

1.6.1.7 Liposomas vectorizados	10
1.7 Inmuno liposomas:.....	11
1.7.1 Anticuerpo monoclonal OX26:	13
1.8 Métodos de preparación de liposomas:.....	15
1.8.1 Vesículas multilamelares (MLV):	15
1.8.2 Vesículas unilamelares pequeñas (SUV):	15
1.8.2.1 Formulación de liposomas SUV por ultrasonido:	16
1.9 Características liposomales:.....	16
1.9.1 Tamaño de vesícula:.....	16
1.9.2 Índice de polidispersión:	17
1.9.3 Potencial Zeta:	17
1.9.5 Porcentaje de proteínas:	18
1.10 Macamidas:	18
1.10.1 N-3-metoxibencil-linoleamida:.....	20
1.10.2 Sistema Cannabinoide:	21
CAPITULO II	24
2.1 MATERIALES:	24
2.1.1 Material de laboratorio:	24
2.1.2 Reactivos:	24
2.1.3 Equipos:.....	26
2.2 LUGAR DE INVESTIGACIÓN	26
2.3 METODOLOGÍA	26
2.3.1 Desarrollo y optimización de liposomas convencionales:	26
2.3.2 Desarrollo y optimización de liposomas furtivos:	27
2.3.3 Desarrollo y optimización de inmunoliposomas:.....	31
2.3.3.1 Fraccionamiento de anticuerpos OX26	32

2.3.3.2 Acoplamiento de anticuerpos a los inmunoliposomas	32
2.3.4 Caracterización de liposomas convencionales, furtivos e inmunoliposomas	32
2.3.4.1 Medición del tamaño e índice de polidispersión:	33
2.3.4.2 Medición de potencial Zeta:	33
2.3.4.3 Porcentaje de encapsulación de la macamida sintética N-3- metoxibencil-linoleamida:	33
2.3.4.4 Determinación del porcentaje de acoplamiento de los fragmentos F(ab') ₂ en los inmunoliposomas:	33
CAPITULO III	35
3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	35
3.1.1 Desarrollo y optimización de liposomas convencionales:	35
3.1.2 Desarrollo y optimización de liposomas furtivos:	37
3.1.3 Desarrollo y optimización de Inmunoliposomas:	47
3.1.3.1 Fraccionamiento de anticuerpos OX26	48
3.1.3.2 Acoplamiento de anticuerpos a los inmunoliposomas.	49
3.2 CONCLUSIONES:	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS.....	64

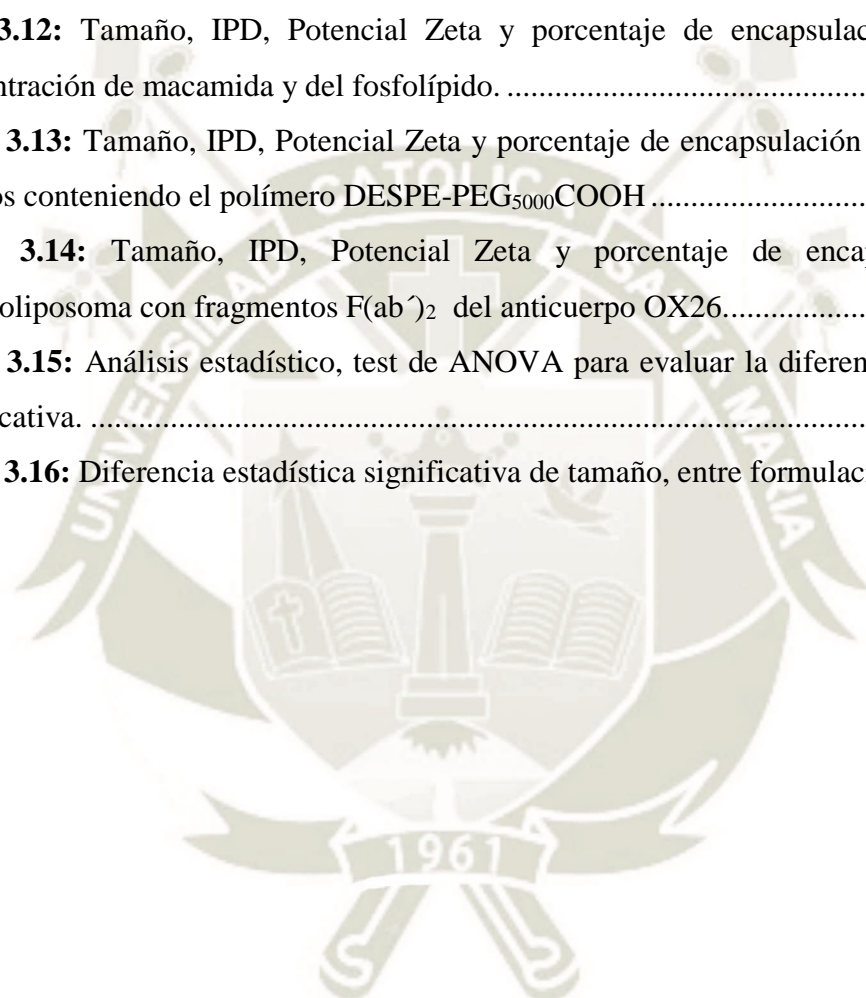
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura: 1.1: Nanovectores orgánicos e inorgánicos	3
Figura: 1.2: Estructura de un liposoma.	6
Figura: 1.3: Clasificación de liposomas según su tamaño y número de bicapas lipídicas	7
Figura: 1.4: Clasificación de liposomas según su funcionalidad	11
Figura: 1.5: Estructura general de las macamidas	20
Figura: 1.6: Estructura química de la macamida N-3-metoxibencil-linoleamid.....	20
Figura 1.7: Órganos en donde se encuentran receptores CB1 y CB2	22
Figura 1.8: Síntesis, liberación, receptación y degradación de anandamida.....	23
Figura: 2.1: Diseño de la estructura de los diferentes tipos de liposomas diseñados en este proyecto.	34
Figura: 3.1: Tamaño e índice de polidispersión de liposomas convencionales	36
Figura: 3.2: Tamaño e índice de polidispersión de liposomas con colesterol y DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	38
Figura: 3.3: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido	41
Figura: 3.4: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y concentración de DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	41
Figura: 3.5: Optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud y la temperatura.	44
Figura: 3.6: Conjugación del fragmento F(ab) ₂ del anticuerpo OX26 y el polímero DESPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH-.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Formulación de liposomas convencionales.....	26
Tabla 2.2: Formulación de liposomas furtivos	28
Tabla 2.3: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido.	28
Tabla 2.4: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y la concentración de DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	29
Tabla 2.5: Optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud del ultrasonido y la temperatura	29
Tabla 2.6: Optimización de liposomas furtivos por concentración de N-3-metoxi bencil- linoleamida.	30
Tabla 2.7: Optimización de liposomas furtivos por concentración del fosfolípido y de N- 3-metoxi bencil-linoleamida.....	31
Tabla 2.8: Formulación de liposomas furtivos con el polímero DSPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH	31
Tabla 3.1: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de liposomas convencionales.....	36
Tabla 3.2: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de liposomas furtivos ..	37
Tabla 3.3: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa, comparándolo con F1.....	39
Tabla 3.4: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.	39
Tabla 3.5: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de la optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y concentración de DSPE- PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	39
Tabla 3.6: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa según el tamaño	42
Tabla 3.7: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.6.	42
Tabla 3.8: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de la optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud y la temperatura.	43

Tabla 3.9: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa.	45
Tabla 3.10: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.6.3.	45
Tabla 3.11: Tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta y porcentaje de encapsulación según la concentración de macamida.....	46
Tabla3.12: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación según su concentración de macamida y del fosfolípido.	46
Tabla 3.13: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación del liposomas furtivos conteniendo el polímero DESPE-PEG ₅₀₀₀ COOH	48
Tabla 3.14: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación del inmunoliposoma con fragmentos F(ab') ₂ del anticuerpo OX26.....	51
Tabla 3.15: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa.	51
Tabla 3.16: Diferencia estadística significativa de tamaño, entre formulaciones.	52



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Tabla de curva de calibración para porcentaje de encapsulación	64
ANEXO 2: Tabla de resultados de porcentaje de encapsulación	64
ANEXO 3: Tabla de calibración para porcentaje de proteínas	65
ANEXO 4: Tabla de resultados de absorbancia y porcentaje de proteínas	65
ANEXO 5: Procedimiento de formulación de liposomas	66
ANEXO 6: Caracterización de liposomas	68



LISTA DE ABREVIATURAS

MLV:	Vesículas multilamelares
LUV:	Vesículas unilamelares grandes
SUV:	Vesículas unilamelares pequeñas
BHE:	Barrera Hematoencefálica
IPD:	Índice de Polidispersión
SNC:	Sistema Nervioso Central
DMPC:	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DPPC:	Dipamitoil-fosfatidilcolina
T_m:	Temperatura de transición
PEG:	Polietilenglicol
DSPE-PEG-2000-OCH₃:	1,2 – distearoil – sn – glicero- 3-fosfoetanolamine-N-[(polietilen glicol)-2000]
DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH:	1,2 – distearoil – sn – glicero – 3 - fosfoetanolamina -N-[carboxi (polietilen glicol)-5000]
IgG:	Inmunoglobulina G
FAAH:	Enzima Hidrolasa Amida de Ácidos Grasos
PBS:	Tampón Fosfato Salino
EDC:	Hidrocloreuro de N- (3- (dimetilamino) propil) -N'-etil-carbodiimida
Sulfo-NHS:	N-hidroxisulfosuccinimida
MES:	Tampón 2-(Nmorfolino) ácido etanosulfónico
HPLC:	Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de arreglo de diodos

ANOVA:	Análisis de la varianza
DF:	Grados de libertad
SS:	Sumatoria de cuadrados
MS:	Promedio de los cuadrados
F:	Prueba F estadística
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
AEA:	Araquidonil-etanolamina o anandamida
NADA:	N-araquidonil-dopamina
2-AG:	2-araquidonilglicerol
NE:	Nodalín éter
VIR:	Virodamida

RESUMEN

Uno de los mayores problemas de la industria farmacéutica es el ingreso de fármacos a través de barreras específicas del organismo como lo es la Barrera Hematoencefálica, la cual evita el ingreso de xenobioticos al Sistema Nervioso Central, es por esto que la Nanomedicina empieza a desarrollar nanovectores con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos adheridos a la superficie de los nanovectores para lograr un tratamiento específico. Esto se traduce en una menor dosis del fármaco y menores efectos secundarios en tejidos periféricos. Los liposomas son nanovectores ampliamente utilizados para la vectorización de fármacos, puesto que son biocompatibles, fáciles de manipular, estables y poseen la capacidad de poder encapsular tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos. La optimización de estos inmunoliposomas comprende las características necesarias para ayudar a que lleguen a la Barrera Hematoencefálica y así minimizar efectos secundarios. Para esto hay que tener en cuenta los parámetros de tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta, porcentaje de encapsulación del fármaco y porcentaje de conjugación del anticuerpo o sus fragmentos, este último siendo medido como proteína, ya que la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida posee un efecto neuroprotector y puede ser utilizada a elevadas dosis para tratar diferentes enfermedades neurológicas es que se decide encapsularla en los inmunoliposomas. Se logró optimizar la formulación de inmunoliposomas que poseen los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo OX26 y que encapsulan la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida. Estos poseen un tamaño de 133.5 ± 4.2 nm, un índice de polidispersión de 0.28 ± 0.01 , un potencial Zeta de -9.71 ± 0.9 mV, un porcentaje de encapsulación de $78,73 \pm 6.0\%$ y un porcentaje de proteínas

del $64.94 \pm 3.5\%$. Es así que esta formulación puede en adelante ser estudiada en modelos *in vitro* o *in vivo* de enfermedades del Sistema Nervioso Central, en los cuales la macamida antes mencionada tenga propiedades farmacológicas.

Palabras clave: Barrera Hematoencefalica, nanotecnología, anticuerpo OX26, inmunoliposoma.



ABSTRACT

One of the major problems of the pharmaceutical industry is the entry of drugs through specific barriers of the organism such as the Blood Brain Barrier, which prevents the entry of xenobiotics to the Central Nervous System, which is why Nanomedicine begins to develop nanovectors with antibodies or fragments of antibodies attached to the surface of the nanovectors to achieve a specific treatment. This translates into a lower dose of the drug and fewer side effects in peripheral tissues. Liposomes are nanovectors widely used for drug vectorization, since they are biocompatible, easy to manipulate, stable and have the ability to encapsulate both hydrophilic and lipophilic drugs. The optimization of these immunoliposomes includes the necessary characteristics to help them reach the Blood Brain Barrier and thus minimize side effects. For this it is necessary to take into account the parameters of size, polypersion index, Zeta potential, percentage of encapsulation of the drug and percentage of conjugation of the antibody or its fragments, the latter being measured as a protein, since the synthetic macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide has a neuroprotective effect and can be used at high doses to treat different neurological diseases is that it is decided to encapsulate in immunoliposomes. It was possible to optimize the formulation of immunoliposomes that possess fragments F(ab)₂ of the OX26 antibody and that encapsulate the synthetic macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide. These have a size of 133.5 ± 4.2 nm, a polypersion index of 0.28 ± 0.01 , a Zeta potential of -9.71 ± 0.9 mV, an encapsulation percentage of $78.73 \pm 6.0\%$ and a protein percentage of $64.61 \pm 7.4\%$. Thus, this formulation can be studied in *in vitro* or *in vivo* models of diseases of the Central Nervous System, in which the aforementioned macamide has pharmacological properties.

Keywords: Hematoencephalic barrier, nanotechnology, OX26 antibody, immunoliposome.